

Method of preparing lipid vesicles by ultrasonic treatment, the use of this method and apparatus for its application

Patent number: EP0052322

Publication date: 1982-05-26

Inventor: GERSONDE KLAUS PROF DR MED; SCHAL WILFRIED DR

Applicant: GERSONDE KLAUS PROF DR (DE)

Classification:

- **International:** A61K9/50

- **european:** A61K9/127P; A61K9/50H8B

Application number: EP19810109575 19811109

Priority number(s): DE19803042360 19801110

Also published as:

EP0052322 (A3)
EP0052322 (B1)

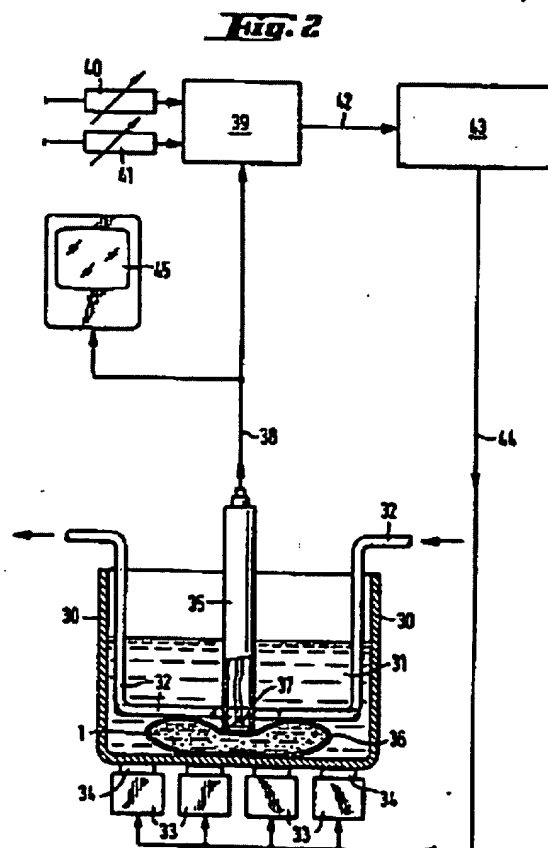
Cited documents:

 DE2338503

Report a data error here

Abstract of EP0052322

1. A method of preparing lipid vesicles from biological membranes or lipid suspensions, in which the lipid suspensions or lipid particles to be desintegrated are ultrasonically treated in a dispersion fluid inside a treatment container at a substantially constant temperature, characterized in that the size respectively size distribution of the lipid vesicles, effective for the desired purpose, and the optimum ultrasonic frequency and intensity in the dispersion fluid required for obtaining this size respectively this size distribution are determined, and that the thus determined optimum ultrasonic frequency and intensity, with the other constant conditions, are maintained constant in such a manner that during the ultrasonic treatment the actual value of frequency and intensity of the ultrasonic field in the reaction medium is continuously measured and the output power and the frequency of the electric generator supplying the sound transmitter are controlled in dependence upon the actual value of the frequency and intensity of the ultrasonic field.



Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY

①



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

①

Veröffentlichungsnummer: **0 052 322**
B1

⑫

EUROPÄISCHE PATENTSCHRIFT

④

Veröffentlichungstag der Patentschrift:
27.03.85

⑥

Int. Cl.: **A 61 K 9/50**

⑦

Anmeldenummer: **81108575.1**

⑧

Anmeldetag: **09.11.81**

⑤

Verfahren zur Herstellung von Lipid-Vesikeln durch Ultraschallbehandlung, Anwendung des Verfahrens und Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens.

③

Priorität: **10.11.80 DE 3042360**

④

Veröffentlichungstag der Anmeldung:
28.05.82 Patentblatt 82/21

⑤

Bekanntmachung des Hinweises auf die Patenterteilung:
27.03.85 Patentblatt 85/13

⑧

Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE FR GB LI NL SE

⑥

Entgegenhaltungen:
DE - A - 2 338 503

FOLIA BIOCH. ET BIOL. GRAECA, Special Issue, Band XIV, 1978

⑦

Patentinhaber: **Gersonde, Klaus, Prof. Dr., Preusweg 69, D-5100 Aachen (DE)**

⑦

Erfinder: **Gersonde, Klaus, Prof. Dr. med., Preusweg 69, D-5100 Aachen (DE)**
Erfinder: **Schäl, Wilfried, Dr., Tannenwaldweg 27, D-6380 Bad Homburg (DE)**

⑦

Vertreter: **Blermann, Wilhelm, Dr.-Ing., Morillenhang 39, D-5100 Aachen (DE)**

EP 0 052 322 B1

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents im Europäischen Patentblatt kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99(1) Europäisches Patentübereinkommen).

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von uniformen, unilamellaren sogenannten kleinen Lipid-Vesikeln, insbesondere ein Verfahren zum Überführen von lamellär angeordneten Lipiden in Lipidvesikel, bei dem die zu desintegrierenden Lipid-Strukturen (Lamellen) in einer Suspensionsflüssigkeit innerhalb eines Beschallungsgefäßes bei im wesentlichen konstanter Temperatur einer Ultraschallbehandlung unterworfen werden. Die Erfindung umfaßt ferner geeignete Vorrichtungen zur Durchführung des Verfahrens.

Lipid-Vesikel werden zum Beispiel für medizinisch-therapeutische und wissenschaftliche Zwecke benötigt. Arzneimittel, die einen intrazellulären Wirkort haben, müssen die Zell-Membran passieren können. Viele Effektoren, die den intrazellulären Stoffwechsel kontrollieren und in der Zelle gebildet werden, können die Zelle weder verlassen noch in diese von außen eindringen. Der therapeutische Einsatz dieser Stoff-Klasse macht daher einen Transportmechanismus erforderlich, der es erlaubt, nicht-membran-permeable Stoffe in die Zellen hineinzuschleusen, ohne daß diese Stoffe die Zellen wieder verlassen können. Ein solcher Transportmechanismus soll darüber hinaus möglichst unabhängig von dem zu transportierenden Wirkstoff sein, also jede Art von Effektor transportieren können, andererseits aber Zell-spezifisch sein, d. h. den Transport nur in bestimmte Zellen ermöglichen. Ein Transport-System mit den obengenannten Eigenschaften stellen Lipid-Vesikel dar, welche die verschiedensten Stoffe einschließen können, wie Enzyme, Arzneimittel, Chelat-bildende Substanzen, Hormone, Zell-Effektoren, Antigene, Antikörper, Interferon-Induktoren und Gene. In den Lipid-Vesikeln sind das Lösungsmittel und die im Lösungsmittel gelösten Stoffe von Phospholipid-Doppelschichtmembranen umschlossen. Die Lipid-Membran hat eine Dicke von 4 nm, die Vesikel können einen Durchmesser von 25 bis 120 nm annehmen. Die Größe der Vesikel läßt sich mit Hilfe der Laser-Lichtstreuung, durch Ultrazentrifugation, Gelfiltration oder im Raster-Elektronenmikroskop bestimmen.

Ein wichtiges Anwendungsgebiet der Lipid-Vesikel ist die Inkorporierung von Inositolhexaphosphat (IHP) in rote Blutzellen nach dem von Y. C. Nicolau und K. Gersonde beschriebenen Verfahren (US-Patent 4 192 869), zur Herabsetzung der Sauerstoff-Affinität des Hämoglobins. Man weiß nämlich, daß z. B. bei der Lagerung von Blutkonserven die Sauerstoff-Affinität des Hämoglobins in den roten Blutzellen ständig zunimmt. Ebenso beobachtet man bei bestimmten Krankheiten eine erhöhte Sauerstoff-Affinität des Hämoglobins. Diese erhöhte Sauerstoff-Affinität führt dazu, daß nur ein geringer Anteil des Sauerstoffs, der an Hämoglobin gebunden ist und im Blut zirkuliert, tatsächlich an das Gewebe abgegeben wird. Diese hohe O₂-Affinität

des Hämoglobins kann durch Bindung von bestimmten Effektoren an das Hämoglobin herabgesetzt werden. Der stärkste Effektor dieser Art ist das Inositolhexaphosphat (IHP). Die Inkorporierung von IHP wird erreicht dadurch, daß intakte Zellen mit IHP-beladenen Lipid-Vesikeln inkubiert werden, wobei durch Fusion der Lipid-Membranen der Zelle und der Vesikel IHP in die Zelle eingeschleust wird und dort seine Wirkung erzielt, nämlich die Veränderung der O₂-Affinität des Hämoglobins, meßbar als »Rechtsverschiebung« der Hämoglobin-O₂-Dissoziationskurve. Nach Rückkehr dieser IHP-beladenen roten Blutzellen in den Kreislauf wird ein erheblich höherer Anteil der in den roten Blutzellen gespeicherten O₂-Menge in der Peripherie abgegeben. Diese Eigenschaft der modifizierten roten Blutzellen bleibt während des gesamten Lebens der Zelle erhalten.

Für die Inkorporierung von Inositolhexaphosphat in rote Blutzellen werden kleine, unilamellare IHP-beladene Lipid-Vesikel mit einem Durchmesser von 20 bis 50 nm benötigt. Es ist bekannt, Lipid-Vesikel durch Desintegration von Lipid-Suspensionen im Ultraschallfeld herzustellen. Der Fortschritt in der Anwendung von Lipid-Vesikeln in der Therapie vollzieht sich bisher nur sehr langsam, da die Herstellung von für die Fusion mit den roten Blutzellen geeigneten Lipid-Vesikeln in ausreichender Menge mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden ist. Die für diesen Zweck geeigneten Lipid-Vesikel müssen nämlich nicht nur in großen Mengen hergestellt werden können, sondern auch reproduzierbar von einheitlicher Größe und somit dosierbar in der therapeutischen Anwendung sein. Die nachträgliche Anwendung von Trennverfahren zum Abtrennen geeigneter Fraktionen der Lipid-Vesikel wirft vielerlei Probleme auf, z. B. Aufrechterhaltung der Sterilität und Anwendung aufwendiger und zeitraubender Trenn-Techniken, die die biologische Effektivität der Vesikel, die nur eine Halb-Lebenszeit von ca. 1 Tag haben, stark vermindern. Das einzige Verfahren, das die Herstellung großer Mengen von Vesikeln in kurzer Zeit erlaubt, ist die Desintegration im Ultraschall. Außer von der Art und Zusammensetzung der Lipid-Membran der Vesikel hängen der Erfolg und die Reproduzierbarkeit der wissenschaftlichen Untersuchung bzw. der therapeutischen Behandlung, d. h. Einschleusung von IHP in rote Blutzellen, wesentlich von der Größe der Lipid-Vesikel ab. Die Kontrolle, ob sich bei der Desintegration der Lipid-Suspension die Lipid-Vesikel in ausreichender Homogenität und somit Qualität und in ausreichender Menge gebildet haben, erfolgt in der Weise, daß man mit den hergestellten Lipid-Vesikeln die gewünschten IHP-Einschleusungsversuche in rote Blutzellen durchführt, das intrazelluläre IHP chemisch nachweist und die Hämoglobin-O₂-Dissoziationskurve intakter Zellen mißt bzw. die gewünschte biologische oder therapeutische Wir-

kung der IHP-beladenen roten Blutzellen im Tier-
versuch nachweist. Die Ergebnisse der Versuche
bzw. der Erfolg der Behandlung können also erst
nach aufwendigen Experimenten beurteilt wer-
den, und der Erfolg der Ultraschallbehandlung,
nämlich die Herstellung von für die Fusion mit
den roten Blutzellen befähigten Vesikeln, erst im
Nachhinein erkannt werden.

Es hat sich gezeigt, daß die Herstellung von
Lipid-Vesikeln — insbesondere in großen Volumina,
wie sie für therapeutische Verfahren erforderlich
sind — mit gleichbleibenden Eigenschaften
mit Hilfe der bekannten Ultraschall-Technik
schwierig ist. Trotz Einhaltung anscheinend völlig
gleicher äußerer Bedingungen bei der Desintegration
der Lipid-Suspensionen im Ultraschallfeld
gelingt es bisher nicht, stets die gleiche
Ausbeute an sogenannten kleinen unilamellaren
und somit fusionswirksamen Lipid-Vesikeln zu
erhalten.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, das
eingangs genannte Verfahren zur Herstellung
von Lipid-Vesikeln, die erfolgreich Effektoren in
Zellen einschleusen, dahingehend weiterzuentwickeln,
daß der Wirkungsgrad des Verfahrens erhöht wird,
und daß in reproduzierbarer Weise eine hohe
Ausbeute an für den jeweils gewünschten Zweck
hochwirksamen Lipid-Vesikeln erzielt wird.

Die Erfindung besteht darin, daß die für den
gewünschten Zweck wirksamste Vesikelgröße
bzw. Vesikelgrößenverteilung, sowie die für die
Erzielung dieser Vesikelgröße bzw. Vesikelgrößen-
verteilung optimale Ultraschall-Frequenz und
-Intensität ermittelt wird, und daß die so
ermittelte optimale Ultraschall-Frequenz und -
Intensität der bei im übrigen gleichen Behand-
lungsbedingungen dadurch konstantgehalten wird,
daß während der Ultraschallbehandlung der
Istwert der Frequenz und der Intensität des
Ultraschallfeldes in dem Reaktionsmedium fort-
laufend gemessen, und in Abhängigkeit von die-
sem Istwert die Ausgangsleistung und die Fre-
quenz des den Schwingungsgeber speisenden
elektrischen Generators geregelt wird.

Der Erfindung liegt die Erkenntnis zugrunde,
daß bei Verwendung der Vesikel zu therapeuti-
schen Zwecken Größe bzw. Größenverteilung
der Vesikel für die Wirksamkeit derselben von
ausschlaggebender Bedeutung ist, und daß an-
dererseits die Größe und Homogenität der im
Ultraschallfeld erzeugten Vesikel in empfindli-
cher Weise von der Konstanz und Intensität des
auf die Lipide einwirkenden Ultraschallfeldes
abhängen. Während es bisher üblich ist, die in
den Schallgeber eingekoppelte Schallenergie zu
messen und konstant zu halten, schlägt die Erfin-
dung vor, die in dem Reaktionsmedium wirksame
Schallenergie zu messen und gezielt zu ver-
ändern, und zwar in der Weise, daß die effektive
Schallenergie im Reaktionsmedium selbst auf ihrem
optimalen Wert konstantgehalten wird. Durch das
Messen der effektiven Schallenergie im Reaktions-
medium selbst, und durch die Verwendung dieses
Istwertes zum Regeln der ein-

gekoppelten Schallenergie, werden alle Einflüsse
kompensiert, die die effektive Schallintensität
und die Schallfrequenz am Vesikel-Bildungsort
beeinflussen, wie z. B. unterschiedliche und sich
verändernde Absorption der Schallenergie mit
fortschreitender Reaktion, sich ändernde geo-
metrische Verhältnisse innerhalb des Reaktions-
mediums bei Auftreten von Gasbläschen wäh-
rend der Ultraschallbehandlung, sowie Reflexion
eines Frequenzbandes von Schallwellen, das
sich mit den vom Schallgeber abgestrahlten
Schallwellen überlagert, und gegebenenfalls bei
phasenverschobener Überlagerung bis zur Aus-
löschung der Schallenergie führt.

Wenn man also gemäß dem erfindungsgemä-
ßen Verfahren zunächst mit Hilfe der bekannten
Untersuchungsmethoden den für den jeweiligen
Zweck optimalen Vesikeldurchmesser bzw. die
optimale Verteilungskurve der wirksamsten Ve-
sikeldurchmesser feststellt, sodann in einer wei-
teren Versuchsreihe die optimalen Ultraschall-
bedingungen wie Frequenz und Schalldruck er-
mittelt, die zu der gewünschten Verteilungskur-
ve führen, und dann die so ermittelte optimale
Ultraschallintensität und Ultraschallfrequenz in-
nerhalb des Reaktionsmediums während der
Reaktionsdauer konstant hält, erhält man eine
sehr hohe Ausbeute an für den jeweiligen Zweck
außerordentlich wirkungsvollen Lipid-Vesikeln.

Das erfindungsgemäße Verfahren läßt sich
nicht nur für die Herstellung von Lipid-Vesikeln,
sondern mit demselben Erfolg auch zum Behan-
deln von natürlichen biologischen Membranen
und deren Umwandlung in Vesikel anwenden,
beispielsweise bei der Erforschung von Funktion
und Struktur von Membran-Enzymen. Auch hier-
für ist es nämlich erforderlich, die Membran-
Enzyme reproduzierbar in Vesikel bestimmter
Größe zu überführen, was nach den bekannten
Verfahren nicht mit ausreichender Sicherheit
möglich ist.

Weitere Einzelheiten und Vorteile des erfin-
dungsgemäßen Verfahrens werden nachfolgend
anhand der Zeichnungen und anhand von Aus-
führungsbeispielen näher beschrieben. In den
Zeichnungen zeigt

Fig. 1 eine für die Herstellung von kleineren
Mengen von Lipid-Vesikel-Suspensionen geeig-
nete Vorrichtung mit den Merkmalen der Erfin-
dung, teilweise in schematischer Darstellung,
und

Fig. 2 eine für die Herstellung von Lipid-Vesi-
kel-Suspensionen in Steril-Packungen für den
klinischen Gebrauch in Liter-Quantitäten geeig-
nete Vorrichtung, ebenfalls in teilweise schema-
tischer Darstellung.

Das Reaktionsmedium 1 in Form einer Sus-
pension eines Lipides in einem geeigneten Dis-
persionsmittel befindet sich in dem inneren zy-
linderförmigen Rohr 2 des doppelwandigen glä-
sernen Reaktionsgefäßes 3. Der Boden des
Reaktionsgefäßes 3 weist eine zu dem Reakti-
onsraum 3 durchgehende Öffnung auf, in die ein
Schallaufnehmer 5 eingesetzt ist. Der Schallauf-
nehmer 5 ist mit Hilfe einer Epoxidharzschicht 6

mit der die Öffnung umgebenden Wand 7 verklebt und abgedichtet. Von oben taucht in das Reaktionsmedium 1 ein Ultraschall-Schwingungsgeber 8 ein. Der aus dem Reaktionsgefäß 3 oben herausragende Teil 9 des Schwingungsgebers 8 ist mit einer Kupplung 9 für den Stromanschluß versehen.

Durch die doppelte Wand des Reaktionsgefäßes wird ein Hohlraum 10 gebildet, der von Kühlwasser durchströmt ist. Die Rohrstützen 11 und 12 dienen zur Zuleitung bzw. zur Abführung des Kühlwassers. Der Rohrstutzen 13 führt in den Reaktionsraum oberhalb des Reaktionsmediums 1 und dient zur Zuführung eines Inertgases wie Argon. Nach oben ist der Reaktionsraum abgeschlossen durch einen Deckel 14. Durch die zwischen dem Deckel 14 und dem Ultraschallgeber bzw. der Gefäßwand verbleibenden Spalte kann das unter geringem Überdruck stehende Inertgas entweichen.

Der Schallaufnehmer 5 weist als eigentlichen Schalldruck- bzw. Schallintensitätsempfänger an seinem oberen, mit dem Reaktionsmedium 1 in Kontakt stehenden Ende eine Piezo-Scheibe 18 auf, die in dem dargestellten Fall radial in einem Halterohr eingebaut, und in diesem Halterohr beispielsweise mit Epoxidharz eingeklebt und abgedichtet ist. Das von der Piezo-Scheibe 18 gelieferte elektrische Signal ist ein Maß für die effektive Schallfrequenz und die effektive Schallintensität in dem Reaktionsmedium. Dieses elektrische Signal stellt den Istwert des Regelkreises dar und wird über die Leitung 20 dem Regelverstärker 21 zugeführt. Auf dem Oszillographen 22 können gegebenenfalls die effektive Frequenz und die Schallintensität visuell verfolgt, und erforderlichenfalls von Hand Nachregulierungen der Frequenz und der Ausgangsleistung des Hochfrequenzgenerators 23 vorgenommen werden.

Dem Regelverstärker 21 wird über eine Sollwert-Einstell-Vorrichtung 24 der Sollwert für die Ultraschall-Intensität, und über eine Sollwert-Einstell-Vorrichtung 25 der Sollwert für die Ultraschall-Frequenz vorgegeben. Bei Abweichungen der Istwerte der Frequenz und der Intensität des Ultraschallfeldes im Reaktionsmedium von den vorgegebenen Sollwerten wird über die Leitung 26 der Ultraschallgenerator 23 angesteuert, dessen Frequenz und/oder Ausgangsleistung so lange verändert werden, bis die innerhalb des Reaktionsmediums 1 gemessenen effektiven Werte mit den vorgegebenen Sollwerten übereinstimmen. Von dem Hochfrequenzgenerator 23 wird der Ultraschallgeber 8 über die Leitung 28 mit der erforderlichen elektrischen Spannung versorgt.

Die in Fig. 2 dargestellte Vorrichtung eignet sich für die Herstellung von Lipid-Vesikeln in größeren Quantitäten. Das Reaktionsgefäß ist eine oben offene zylindrische rechteckige Wanne 30 aus korrosionsbeständigem Cr-Ni-Stahl. Die Kühlung der Flüssigkeit 31 in dem Reaktionsgefäß erfolgt durch eine Kühlschlangenordnung 32, die in die in der Wanne 30 befindliche

Flüssigkeit 31 eingesetzt wird. Unter dem Boden der Wanne 30 sind auf der Außenseite acht elektroakustische Wandler 33 angeordnet, deren Schwingungsgeber 34 an den Boden der Wanne 30 angekoppelt sind. Die Schallenergie wird so auf die Flüssigkeit 31 in der Wanne 30 übertragen. In die Flüssigkeit 31 taucht von oben der Schallaufnehmer 35 ein. Das Reaktionsmedium selbst befindet sich in einem verschlossenen Steril-Beutel 36, der durch die Kühlschlangenordnung 32 innerhalb der Flüssigkeit 31 wenig oberhalb des Bodens der Wanne gehalten wird. Der Schallaufnehmer 35 wird so weit abgesenkt, daß der Schallaufnahmekopf, d. h. die Piezo-Scheibe 37, gegen den Steril-Beutel 36 gedrückt wird, und so das Ultraschallfeld in dem Reaktionsmedium erfaßt.

Das von der Piezo-Scheibe 37 gelieferte Signal steuert über die Leitung 38 den Regelverstärker 39 an und liefert diesem die Istwerte für den Regelvorgang. Die Sollwerte für die Frequenz und die Intensität des Ultraschalls werden vorgegeben durch die Sollwert-Vorgabeeinrichtung 40 bzw. 41. Bei Abweichung der Istwerte von den vorgegebenen Sollwerten wird über die Leitung 42 der regelbare elektrische Generator 43 angesteuert, dessen an die elektromagnetischen Wandler 33 über die Leitung 44 abgegebene Ausgangsleistung und/oder Frequenz so lange verändert werden, bis Sollwerte und Istwerte übereinstimmen. Die von der Piezo-Scheibe 37 gemessene Frequenz und Amplitude des Ultraschallfeldes können auf dem Oszillographen 45 visuell beobachtet werden, so daß auch ggf. ein manueller Eingriff in die Regelung möglich ist.

Mit Hilfe der beschriebenen Vorrichtungen werden beispielsweise folgende Reaktionen durchgeführt:

Beispiel 1

Es sollen IHP-beladene Lipid-Vesikel für therapeutische Zwecke hergestellt werden, und zwar zur Einschleusung von IHP in rote Blutzellen mittels Fusion zur Verbesserung der O₂-Freisetzungseigenschaften der roten Blutzellen. Die generelle Methode zur Präparation von Lipid-Vesikeln ist in der US-Patentschrift 4 192 869 beschrieben, auf die insoweit Bezug genommen wird. Die Lipid-Vesikel sind aus Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin und Cholesterol in molaren Verhältnissen von 8 : 2 : 7 aufgebaut. Diese Lipide werden zunächst in einem organischen Lösungsmittel aus 95 Teilen Chloroform und 5 Teilen Methanol gelöst, um eine homogene Lösung und Mischung dieser Lipide zu erreichen. Dann wird das Lösungsmittel bei 20 Grad Celsius im Rotationsverdampfer entfernt. Der dann im Rundkolben verbleibende Lipid-Film wird mit einer wäßrigen Lösung, welche die biologisch aktive Substanz (hier IHP) enthält, aufgenommen und geschüttelt, so daß sich nunmehr ebene Lipid-Lamellen in dieser Suspension bilden. Diese Suspension enthält Lipide in einer Konzentration

von ca. 17–200 µg/l. Die Suspension ist ferner gesättigt an IHP und zwischen pH 7.0–8.0 gepuffert.

In einer vorausgehenden Versuchsreihe wurde festgestellt, daß sich für die Fusion mit Erythrozyten und die Inkorporierung von IHP in Erythrozyten Vesikel eignen, die die oben beschriebene Zusammensetzung haben und die einen Durchmesser von 25–50 nm (250–500 Å) aufweisen. Die Wirksamkeit ist um so größer, je größer der Mengenanteil dieser Vesikel-Formation in dem jeweiligen Präparat ist. Durch eine weitere Versuchsreihe wurde sodann ermittelt, daß sich diese gewünschte Durchmesser-Verteilung erreichen läßt, wenn die Lipide bei einer in etwa konstanten Temperatur von 37 Grad Celsius mit einer schmalbandigen Schallfrequenz von 20 kHz mit einer effektiven Schallenergie von 3 bis 6 W/cm² beschallt werden.

Die oben beschriebene Lipid-Suspension wird unter Inertgas in das Reaktionsgefäß 3 (Fig. 1) eingefüllt. Das Reaktionsgefäß wird durch das Rohr 13 mit Argon gespült. An den Sollwert-Einstellvorrichtungen 24 und 25 werden sodann die optimale Schallintensität und die gewünschte Schallfrequenz eingestellt. Die beschriebene Regeleinrichtung sorgt dafür, daß die optimale Schallintensität als effektive, auf die Reaktionsflüssigkeit zur vollen Einwirkung kommende Schallintensität während der gesamten Behandlungszeit eingehalten wird. Die Behandlung dauert 30 bis 60 Minuten. Während dieser Zeit wird durch das Kühlwasser die in dem Reaktionsgefäß entwickelte Wärme abgeführt und so die Temperatur konstant gehalten.

Die auf diese Weise erhaltene Vesikel-Suspension wird nun mit roten Blutzellen bei 37 Grad Celsius 1 h inkubiert. Danach werden die roten Blutzellen in isotonischen Puffer pH 7,4 gewaschen und die Hämoglobin-O₂-Dissoziationskurve der modifizierten intakten Zellen gemessen. Der Erfolg der IHP-Inkorporierung wird als »Rechtsverschiebung« der Hämoglobin-O₂-Dissoziationskurve erkannt. Der durch IHP-Bindung an Hämoglobin maximal erreichbare O₂-Halbsättigungsdruck beträgt bei 37 Grad Celsius und pH 7,4 23,5 mbar (95 mmHg).

Der Erfolg der kontrollierten Ultraschall-Methode liegt vor allem darin, daß der maximale IHP-Inkorporierungseffekt mit Volumen-Verhältnissen RBC (Rote-Blutzellen): Vesikel oder mit Lipid-Konzentrationen erreicht wird, die nur noch 10% der Werte betragen, die bei der bisher üblichen unkontrollierten Ultraschallanwendung für eine erfolgreiche IHP-Inkorporierung eingesetzt werden mußten. Daraus resultiert ein erheblicher wirtschaftlicher Vorteil, da Lipide teuer sind und nicht wiederverwendet werden können. Darüber hinaus sind mit der bisher üblichen Methode keine reproduzierbaren Ergebnisse zu erzielen, die unbedingte Voraussetzung für eine sichere Dosierung in der Therapie sind.

Beispiel 2

Bei Lipid-Vesikeln für therapeutische Zwecke besteht die Forderung nach absoluter Keimfreiheit. Da eine Sterilisation der fertigen Vesikel-Suspension auf äußerste Schwierigkeiten stößt, wird folgendes Verfahren angewandt: Die Ausgangskomponenten entsprechend dem Beispiel 1 werden zunächst sterilisiert, und unter sterilen Kautelen in einen ebenfalls sterilisierten Beutel aus Polyäthylen oder Weich-PVC-Folie von etwa 0,5 mm Wandstärke gefüllt. Der Beutel wird steril dicht verschlossen und dann in dem Ultraschallgefäß nach Fig. 2 der Ultraschallwirkung ausgesetzt, wobei der Raum zwischen den Gefäßwänden und dem Beutel mit Wasser ausgefüllt ist. Die Messung der Schallintensität erfolgt in diesem Fall an der Außenseite des Beutels. Unter sonst gleichen Bedingungen wie in Beispiel 1 beschrieben werden die gleichen Ergebnisse erzielt, wenn die den Schwingungsgebern zugeführte Leitung etwa um den Faktor 1,65 erhöht wird. Dieser bei der vorgegebenen Versuchsanordnung anhand der Messungen experimentell ermittelte Faktor repräsentiert die durch die Einbringung des Beutels eintretenden Leistungsverluste.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Lipid-Vesikeln aus biologischen Membranen oder Lipid-Suspensionen, bei dem die zu desintegrierenden Lipid-Suspensionen oder Lipid-Partikel in einer Dispersionsflüssigkeit innerhalb eines Behandlungsgefäßes bei im wesentlichen konstanter Temperatur einer Ultraschallbehandlung unterworfen werden, dadurch gekennzeichnet, daß die für den gewünschten Zweck wirksame Vesikelgröße bzw. Vesikelgrößenverteilung, sowie die für die Erzielung dieser Vesikelgröße bzw. dieser Vesikelgrößenverteilung optimale Ultraschall-Frequenz und -Intensität in der Dispersionsflüssigkeit ermittelt, und daß die so ermittelte optimale Ultraschall-Frequenz und -Intensität bei im übrigen gleichen Behandlungsbedingungen dadurch konstant gehalten wird, daß während der Ultraschallbehandlung der Istwert der Frequenz und Intensität des Ultraschallfeldes in dem Reaktionsmedium fortlaufend gemessen, und in Abhängigkeit von dem Istwert die Ausgangsleistung und die Frequenz des den Schwingungsgeber speisenden elektrischen Generators geregelt wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Regelung des den Ultraschallgeber speisenden Generators mit Hilfe eines automatischen Regelkreises mit Sollwert-Istwert-Vergleich vorgenommen wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß zur Messung der Ultraschall-Intensität und -Frequenz ein in die Reaktionsflüssigkeit eintauchender piezoelektrischer Schallaufnehmer verwendet wird.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß der piezoelektrische Schallaufnehmer am Boden des Reaktionsgefäßes so angeordnet wird, daß die Richtung seiner höchsten Empfindlichkeit gegen den Ultraschallgeber gerichtet ist, während der Ultraschallgeber in das obere Drittel des Mediums eintaucht.

5. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Reaktionsmedium unter einer Inertgasatmosphäre behandelt wird.

6. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Reaktionsmedium sterilisiert und in einem Steril-Beutel eingeschlossen, und der das Reaktionsmedium enthaltende Steril-Beutel innerhalb einer dem Ultraschallfeld ausgesetzten Flüssigkeit behandelt wird.

7. Anwendung des Verfahrens nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6 zur Herstellung von für therapeutische Zwecke bestimmten, mit einem Wirkstoff wie Inositolhexaphosphat beladenen, zur Fusion mit roten Blutzellen befähigten Lipid-Vesikeln.

8. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1, mit einem die Reaktionsflüssigkeit aufnehmenden Behandlungsgefäß und mindestens einem von einem elektrischen Generator gespeisten elektroakustischen Wandler zur Erzeugung eines Ultraschallfeldes in dem Reaktionsmedium, dadurch gekennzeichnet, daß innerhalb des Behandlungsgefäßes (3; 30) als Schallaufnehmer ein akustisch-elektrischer Wandler (18; 37) angeordnet ist, dessen Ausgangssignal zur Regelung der Ultraschall-Intensität und -Frequenz in der Reaktionsflüssigkeit dient.

9. Vorrichtung nach Anspruch 8, gekennzeichnet durch einen den elektrischen Generator (23; 43) ansteuernden Regelverstärker (21; 39) mit Sollwert-Istwert-Vergleich.

10. Vorrichtung nach Anspruch 8 und 9, dadurch gekennzeichnet, daß der akustisch-elektrische Wandler (18; 37) aus einer am Ende eines Rohres angeordneten Piezo-Scheibe besteht, die mit ihrer gegen Schalldruck empfindlichsten Richtung gegen den Schwingungsgeber gerichtet ist.

11. Vorrichtung nach Anspruch 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Geometrie des Ultraschallgebers und des das Medium aufnehmenden Behandlungsgefäßes (3; 30) so gewählt sind, daß die durch Reflexion verursachte Bildung von Ultraschallwellen mit einer von der Sollfrequenz abweichenden Frequenz und/oder mit gegenüber den primären Ultraschallwellen verschobener Phase in dem beschalteten Medium vermieden wird.

12. Vorrichtung nach Anspruch 8 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß das Behandlungsgefäß (3; 30) von einer Kühlflüssigkeit durchströmte Doppelwände aufweist.

13. Vorrichtung nach Anspruch 8 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß das Behandlungsgefäß (3) gegen die Außenatmosphäre abgeschlossen

sen ist und eine Zuleitung (13) für die Zufuhr von Inertgas zu dem Gasraum oberhalb des beschalteten Reaktionsmediums (1) aufweist.

Claims

1. A method of preparing lipid vesicles from biological membranes or lipid suspensions, in which the lipid suspensions or lipid particles to be desintegrated are ultrasonically treated in a dispersion fluid inside a treatment container at a substantially constant temperature, characterized in that the size respectively size distribution of the lipid vesicles, effective for the desired purpose, and the optimum ultrasonic frequency and intensity in the dispersion fluid required for obtaining this size respectively this size distribution are determined, and that the thus determined optimum ultrasonic frequency and intensity, with the other constant conditions, are maintained constant in such a manner that during the ultrasonic treatment the actual value of frequency and intensity of the ultrasonic field in the reaction medium is continuously measured and the output power and the frequency of the electric generator supplying the sound transmitter are controlled in dependence upon the actual value of the frequency and intensity of the ultrasonic field.

2. A method as defined in claim 1, characterized in that control of the generator supplying the ultrasonic transmitter is realised by means of an automatic control circuit including an actual value — nominal value comparator.

3. A method as defined in claim 1 or 2, characterized in that a piezoelectric sound receiver dipped in the reaction medium is used for measuring the ultrasonic intensity and frequency.

4. A method as defined in claim 3, characterized in that the piezoelectric sound receiver is arranged on the bottom of the reaction container so that its direction of the maximum sensitivity is directed against the ultrasound transmitter, the ultrasound transmitter being dipped into the upper third of the reaction medium.

5. A method as defined in a or more of the claims 1 to 4, characterized in that the reaction medium is treated under an inert gas atmosphere.

6. A method as defined in one or more of the claims 1 to 5, characterized in that the reaction medium is sterilised and enclosed in a sterile bag, and that the sterile bag with the reaction medium inside is treated within a fluid exposed to the ultrasonic field.

7. Application of a method as defined in one or more of the claims 1 to 6 for producing lipid vesicles for therapeutic purposes loaded with an effective substance such as inositolhexaphosphate and capable of fusing with red blood cells.

8. An apparatus for carrying-out the method as defined in claim 1, comprising a treatment container including the reaction fluid and at least one electric-acoustic, by an electric generator

supplied transmitter for producing an ultrasonic field in the reaction medium, characterized in that as a sound receiver an acoustic-electric transducer (18; 37) is arranged within the treatment container (3; 30), the output signal of said transducer being used for controlling the ultrasonic intensity and frequency in the reaction fluid.

9. An apparatus as defined in claim 8, characterized by an control-amplifier (21; 39) including nominal value — actual value comparator, the amplifier (21; 39) being connected with the electric generator (23; 43).

10. An apparatus as defined in claim 8 and 9, characterized in that the acoustic-electric transducer (18; 37) is composed of a piezoelectric disk arranged at the end of a tube so that its most sound-sensitive direction faces against the sound generating means.

11. Apparatus as defined in claim 8 to 10, characterized in that the ultrasound generating means and the treatment container (3; 30) including the medium have geometries which are selected so as to avoid a reflection-caused formation of ultrasonic waves in the medium with a frequency deviating from the nominal frequency and/or with a phase which is offset relative to the phase of the primary ultrasonic waves in the medium.

12. Apparatus as defined in claim 8 to 11, characterized in that the treatment container (3; 30) has double walls with hollow spaces therein through which runs a cooling medium.

13. Apparatus as defined in claim 8 to 12, characterized in that the treatment container (3) is closed from the outer atmosphere and comprises inlet means (13) for supplying an inert gas into the gas-filled space above the reaction medium.

Revendications

1. Procédé pour préparer de vésicules lipidiques à partir de membranes biologiques ou de suspensions lipidiques, dans lequel les suspensions ou particules lipidiques à désintégrer sont soumises à un traitement aux ultra-sons dans un liquide de dispersion à l'intérieure d'un récipient à une température essentiellement constante, caractérisé en ce qu'on détermine, dans le liquide de dispersion, la fréquence et l'intensité optimales d'ultra-son pour obtenir la dimension respectivement la repartition des dimensions des vésicules effectives pour le but souhaité, et qu'on maintient constantes la fréquence et l'intensité d'ultra-son optimales ainsi trouvées, les autres conditions de traitement étant les mêmes, en mesurant continuellement la valeur effective de la fréquence et de l'intensité du champ ultrasonique dans le milieu de réaction, et en réglant la puissance de sortie et la fréquence du générateur électrique alimentant le générateur des ultra-sons en dépendance de ladite valeur effective.

2. Procédé selon revendication 1, caractérisé

en ce qu'on règle générateur alimentant le générateur d'ultra-sons à l'aide d'un circuit de réglage automatique à comparaison valeur de consigne — valeur effective.

3. Procédé selon revendication 1 ou 2, caractérisé en ce qu'on utilise un capteur piézoélectrique de son plongé dans le liquide de réaction, pour mesurer l'intensité et la fréquence des ultra-sons.

4. Procédé selon revendication 3, caractérisé en ce que le capteur piézoélectrique de son est placé au sol du récipient de réaction de telle manière que la direction de sa sensibilité la plus élevée est dirigée vers le générateur des ultra-son, ce dernier étant plongé dans le tiers supérieur du milieu.

5. Procédé selon une ou plusieurs des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le milieu de réaction est traité dans une atmosphère de gaz inerte.

6. Procédé selon une ou plusieurs des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le milieu de réaction est stérilisé et enfermé dans un sac stérile, et que le sac stérile contenant le milieu de réaction est traité à l'intérieure d'un liquide exposé au champ des ultra-sons.

7. Application du procédé selon une ou plusieurs des revendications 1 à 6 pour préparer des vésicules lipidiques destinées aux buts thérapeutiques, chargées d'un médicament comme inositolhexaphosphat et susceptibles à la fusion avec de globules rouges du sang.

8. Dispositif pour la mise en oeuvre du procédé selon revendication 1, comprenant un récipient pour le liquide de réaction et au moins un transducteur électroacoustique alimenté par un générateur électrique, pour créer un champ des ultra-sons dans le milieu de réaction, caractérisé en ce qu'un capteur acoustique-électrique (18; 37) est disposé à l'intérieure du récipient de réaction (3; 30), le signal de sortie dudit capteur (18; 37) servant de régler l'intensité et la fréquence des ultra-sons dans le liquide de réaction.

9. Dispositif selon revendication 8, caractérisé par un amplificateur de réglage (21; 39) à comparaison valeur de consigne — valeur effective, l'amplificateur de réglage étant lié au générateur électrique (23; 43).

10. Dispositif selon revendication 8 et 9, caractérisé en ce que le capteur acoustique-électrique (18; 37) consiste en une piézo-disque disposée à l'extrémité d'un tube, la direction la plus sensible à la pression des sons étant dirigée vers le générateur des vibrations.

11. Dispositif selon revendication 8 à 10, caractérisé en ce que la géométrie du générateur des ultra-sons ainsi que la géométrie du récipient de traitement (3; 30) contenant le milieu sont choisies de telle sorte que la formation, à la suite de réflexions, d'ondes ultrasoniques ayant une fréquence différente de la fréquence de consigne et/ou une phase déviée vis-à-vis de la phase des ondes ultrasoniques primaires, soit évitée dans le milieu exposé aux ultra-sons.

12. Dispositif selon revendication 8 à 11, caractérisé en ce que le récipient de traitement (3; 30) présente des double-parois traversés par un liquide de refroidissement.

13. Dispositif selon revendication 8 à 12, caractérisé en ce que le récipient de traitement (3) est fermé vis-à-vis de l'atmosphère extérieure et présente une conduite (13) destinée à l'alimentation de gaz inerte à l'espace de gaz au dessus du milieu de réaction (1) exposé aux ultra-sons.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

8

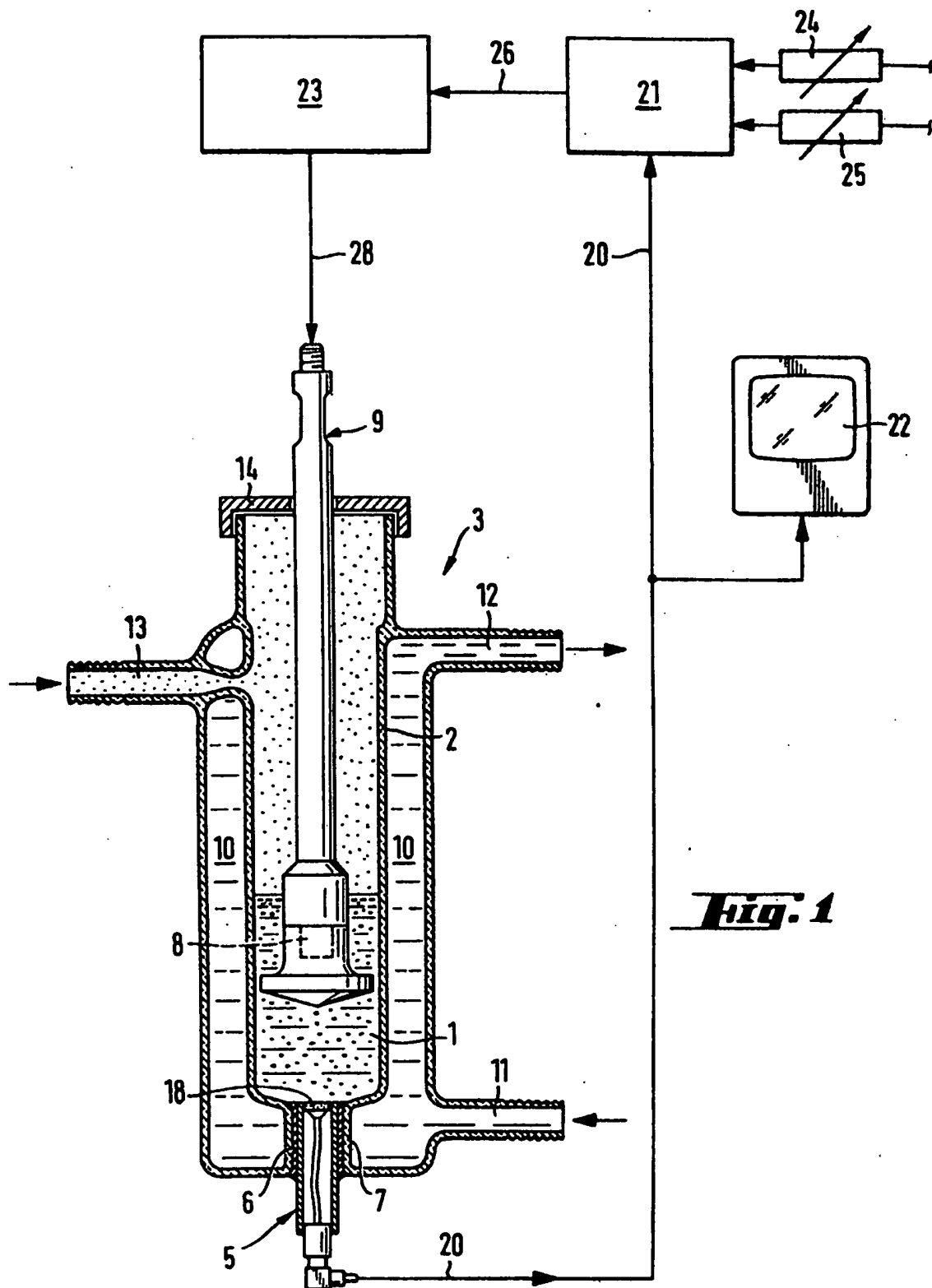
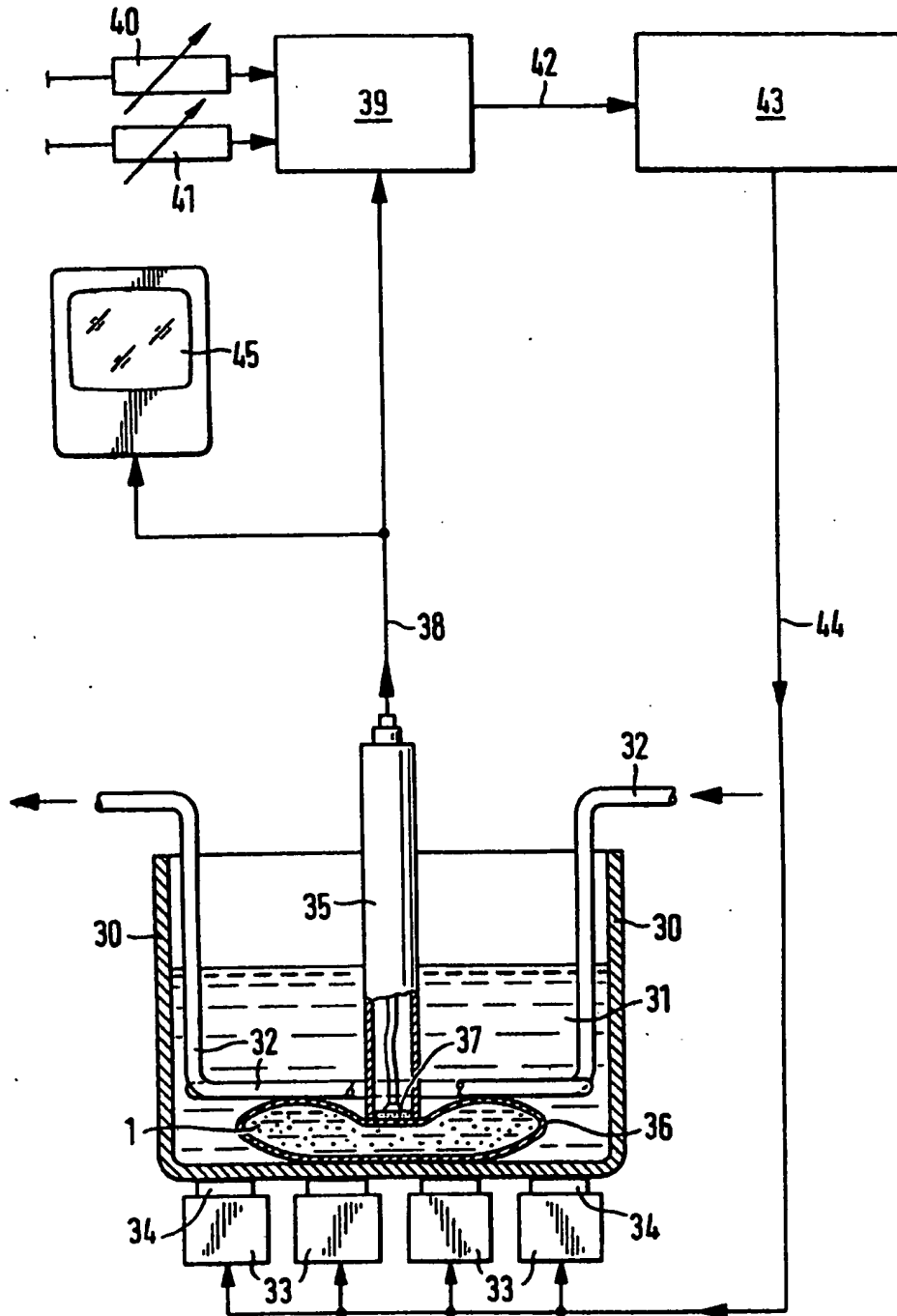


Fig. 1

Fig. 2



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.